中华蜜蜂信息素结合蛋白 OBP10 的基因克隆、原核表达和配基结合特性分析

吴　帆，黄君君，谭　静，唐明珠，李红亮*

（中国计量学院生命科学学院，浙江省生物计量及检疫检验重点实验室，杭州 310018）

摘要：【目的】气味结合蛋白在中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 嗅觉系统中起到重要作用，本实验拟研究中华蜜蜂一个新的信息素结合蛋白 OBP10 及其与蜜蜂信息素以及蜜源开花植物挥发物的结合特性。【方法】本实验通过 RT-PCR 扩增获得 OBP10 基因全长（GenBank 登录号：KP717060.1），以 pET-30a 构建原核表达载体，并以 Ni^{2+} 琼脂糖柱进行重组蛋白表达和分离纯化，在 N-苯基-1-萘胺（N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN）作为荧光报告子下利用荧光光谱法体外研究重组 AcerOBP10 与多种候选化学配基的结合特征。【结果】经多序列联配分析，发现 AcerOBP10 的多个同源基因均为信息素结合蛋白（pheromone binding proteins, PBPs）。配基结合特性分析显示，AcerOBP10 对 14 种候选配基中的蜂王信息素成分对羟基苯甲酸甲酯（HOB）竞争力最大，相对荧光可降至 6.06%，解离常数 11.04 μmol/L；进一步表明 AcerOBP10 属于一个新的中蜂 PBPs。此外，AcerOBP10 也能和包括工蜂信息素（香叶醇和橙花醇）、报警信息素（2-庚酮和乙酸异戊酯）等蜜蜂信息素以及蜜源开花植物挥发物之一的 β-紫罗兰酮结合，表明 AcerOBP10 可能是一种以信息素结合为主的多功能结合蛋白。【结论】AcerOBP10 是中蜂一个新的信息素结合蛋白，与此前我们鉴定的蜂王信息素结合蛋白 AcerASP1 相比，AcerOBP10 对蜜蜂信息素的结合谱更为广泛，这些结果将对进一步研究中华蜜蜂信息素识别和传递提供理论基础，对于深入了解中华蜜蜂嗅觉影响生理功能的行为机制具有重要意义。

关键词：中华蜜蜂；信息素结合蛋白；信息素；荧光竞争；结合特性

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2016)01-0025-08

Molecular cloning, prokaryotic expression and lignand-binding characterization of a novel pheromone binding protein OBP10 in *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

WU Fan, HUANG Jun-Jun, TAN Jing, TANG Ming-Zhu, LI Hong-Liang* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract:【Aim】Odorant-binding proteins (OBPs) play an important role in olfactory system of Chinese bee, *Apis cerana cerana*. In this study, we aim to research the binding characteristics of pheromones and some plant volatiles with a novel pheromone-binding protein OBP10 of *A. cerana cerana*.【Methods】We successfully cloned the gene *AcerOBP*10 from *A. cerana cerana* (GenBank accession no. KP717060.1) by RT-PCR, constructed its prokaryotic expression vector pET30-*AcerOBP*10, and conducted its expression in the optimized conditions *in vitro*. The recombinant protein with biochemical activities was purified by the method of Ni^{2+}-agarose affinity chromatograph. Using 1-NPN as a fluorescence probe, the

基金项目：国家自然科学基金项目(31372254)；中国博士后科学基金(2014M560488, 2015T80624)；杭州市科技计划项目(20140432B12)
作者简介：吴帆，男，1989 年 5 月生，河南信阳人，硕士研究生，研究方向为昆虫嗅觉生理生化，E-mail: wufan2102@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hlli@cjlu.edu.cn
收稿日期 Received: 2015-09-01；接受日期 Accepted: 2015-11-24

binding capability of AcerOBP10 with diverse bee pheromones and plant volatiles was measured by competitive fluorescence assay. 【Results】By analyzing the alignment of the deduced homologous proteins of other insect species, we speculated that AcerOBP10 is a novel PBP of *A. cerana cerana*. The results of competitive fluorescence assay showed that eight out of 14 ligands were able to decrease the relative fluorescence intensity of 1-NPN by more than 50%. Among them, methyl 4-hydroxylbenzoate (HOB), one of queen pheromone components, showed the strongest capability to compete with 1-NPN, causing 93.94% reduction in the relative fluorescence intensity with the K_D value of 11.04 μmol/L. AcerOBP10 was also found to have the capability of binding with worker bee pheromones (geraniol and nerol) and alarm pheromones (heptanone and isoamyl acetate), suggesting that it plays a significant role in recognizing pheromones in the bee olfactory system. AcerOBP10 also had strong binding force with some plant volatiles, like β-ionone. 【Conclusion】As a pheromone-binding protein, AcerOBP10 has a strong binding capability with diverse bee pheromones. Compared with another PBP (AcerASP1), AcerOBP10 seems to have more extensive pheromone binding profiles. The results provide a theoretical basis to explore the molecular mechanism of pheromone recognition and transduction in *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; pheromone-binding protein; pheromone; fluorescent competition; binding characteristics

灵敏的嗅觉系统在昆虫觅食、寻偶、交配、种群管理等活动中发挥至关重要的作用。其中气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)(Pelosi and Maida, 1995)和化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)(Pelosi *et al.*, 2006)是两类基本的小分子可溶性蛋白。根据功能的差异,OBPs 又分为普通气味结合蛋白(general odorant-binding proteins, GOBPs)和信息素结合蛋白(pheromone-binding proteins, PBPs)(Vogt *et al.*, 1991),前者主要是识别一般的气味分子,而后者在信息素的识别和结合中起到关键作用。在发挥功能时,两者首先与脂溶性配基分子结合,再运输它们到达嗅觉受体(olfactory receptors, ORs),这是嗅觉系统发挥功能的基础和前提条件(Kim *et al.*, 1998)。

信息素可以指引昆虫种内种间多种行为。研究表明:信息素对昆虫的定向、召唤、交尾、产卵、聚集、追踪、告警、防御以及种间识别等行为均具有重要的作用(姜勇等, 2002),尤其是在自然进化过程中,信息素对种群维护及蜂王和工蜂在蜂群中的地位和关系起到决定作用(Kocher and Grozinger, 2011)。PBPs 作为信息素结合的受体蛋白,在昆虫对各种信息素分子的识别、传递和处理过程中具有直接的联系(Kaissling, 2001; Jacquin-Joly *et al.*, 2001)。作为一种典型的社会性昆虫,蜜蜂具有发达的信息交流和嗅觉感受系统,已成为研究嗅觉系统的模式生物(Fernandez *et al.*, 2009)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*(简称中蜂)是我国特有的本土蜜蜂,具有采集力强、善于寻找零星蜜源以及适应性强、抗螨抗寒能力强等诸多特点,均优于西方蜜蜂等其他蜜蜂品种(Radloff *et al.*, 2010)。近些年,由于生态环境人为破坏、西方蜜蜂在养蜂业中的规模推广等原因,使得中蜂的分布范围明显缩小,种群及数量急剧下降(杨冠煌, 2005)。为了更好地保护和利用中蜂这一我国特有的种质资源,就需要深入了解和探讨中蜂独特的化学感受和嗅觉系统功能。在此前的研究中,我们已经发现和鉴定了若干种中蜂化学通讯系统相关的基因及其生理功能,如中蜂化学感受蛋白3(chemosensory protein 3, CSP3)(李红亮等, 2011)和触角特异性蛋白2(antennal-specific protein 2, ASP2)(李红亮等, 2013),尤其是中蜂信息素结合蛋白 ASP1,发现其与两种蜂王信息素——对羟基苯甲酸甲酯(HOB)和香草醇(HVA)的亲合力最强(翁琛等, 2013)。

然而蜜蜂是具有复杂社会性行为的昆虫,中蜂蜂王和工蜂之间、工蜂与工蜂之间以及工蜂与幼虫/蛹之间信息交流密切(赵红霞等, 2014),所以中蜂具有除蜂王信息素外的多种信息素,如幼虫信息素(张晗等, 2010)和工蜂报警信息素(Brodmann *et al.*, 2009)等,而这些信息素的识别和传递均需要借助相应的载体,才能实现其在蜂群中的功能,所以仅靠 ASP1 似乎不足以完成这些任务。

目前,在很多昆虫中都已发现多个 PBPs,如稻蛀茎夜蛾 *Sesamia inferens*(Jin *et al.*, 2014)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中(Zhang *et al.*, 2011)均发现了

3 个 PBPs，暗示昆虫的 PBPs 家族常有若干个成员。因此，除了 ASP1 以外，中蜂很有可能还存在其他 PBPs 成员，这对于中蜂这种社会性昆虫维持社会稳定性和成员信息交流等也是必不可少的。通过对中蜂转录组分析和生物信息学筛选，我们预测中蜂的一个气味结合蛋白 AcerOBP10 很有可能是属于一个新的信息素结合蛋白，这对于补充中蜂 PBPs 家族成员，理解信息素识别功能模式等，均具有十分重要的理论意义。

根据上述分析，本实验在克隆中蜂 OBP10 基因，并以 pET-30a 构建原核表达载体诱导重组蛋白表达基础上，利用荧光光谱法研究 AcerOBP10 和信息素以及与蜜蜂相关的植物挥发性气味物质的结合特性，分析 AcerOBP10 在中蜂信息素识别和传递等多种生理行为中可能发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 供试材料

中蜂取自中国计量学院生命科学学院，随机捕捉内勤工蜂 50 头，完整切下触角，加入 200 μL 的 RNAlater，投入液氮速冻后于 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

RNAlater 试剂盒、反转录试剂盒 PrimeScript Reverse Transcriptase System、凝胶回收和质粒提取试剂盒、pMD18-T 载体以及实验中所有内切酶均购自 TaKaRa 公司，总 RNA 提取 RNAqueous@-Micro Kit 试剂盒购于 Ambion 公司，SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于碧云天生物技术研究所，大肠杆菌 DH5α、BL21（DE3）感受态细胞和 pET-30a 表达载体为本实验室自备保存，Kanamycin、甲醇、各种磷酸盐等化学试剂均购自上海生工公司，1-NPN 购自梯希爱（TCI）公司（纯度 >97%），其他配基均购自上海百灵威化学技术有限公司（均为分析纯和色谱纯）。

1.3 中蜂触角总 RNA 提取以及 cDNA 第一链的合成

以 RNAqueous@-Micro Kit 试剂盒操作方法提取中蜂触角总 RNA，并用 15 μL 洗脱缓冲液洗脱。然后采用 PrimeScript Reverse Transcriptase System 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链，总反应体系为 10 μL，包括：5 × PS Buffer 2.0 μL，PS RT 酶 Mix I 0.5 μL，Random 6 Primers（100 μmol/L）0.5 μL，Oligo dT Primer（50 μmol/L）0.5 μL，总 RNA 1.5 μL（≤1 μg），RNase-free H_2O 5 μL。反转录条件为：37℃ 15 min，85℃ 5 s，获得 cDNA 并于 -20℃ 下保存备用。

1.4 中蜂 OBP10 基因扩增及表达载体的构建

根据中蜂工蜂触角转录组测序结果，设计中蜂 OBP10 基因开放阅读框引物，并在正、反向引物中分别引入 *Bam*H Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 限制酶切位点核酸序列（下划线表示）。

正向引物序列为：5′-GCGGATCCATGAAATACTCGATACTGTTGAGC-3′；反向引物序列为：5′-GGAAGCTTTTAAAACAGATAATACGTCCGTGG-3′。

以上述反转录 cDNA 第一条链为模板，用中蜂 OBP10 基因引物进行 PCR 扩增。扩增体系为 25 μL：2 × PCR Mix 12.5 μL，正反引物各 0.5 μL，cDNA 1 μL（≤1 μg），ddH_2O 10.5 μL。PCR 产物经凝胶电泳，回收目的片段并与 pMD18-T 连接构建克隆载体，菌液 PCR 鉴定阳性克隆后送去测序。提取重组 pMD18-T 克隆质粒进行双酶切，回收产物在 16℃ 下用 T4 DNA 连接酶连接过夜，连接产物全部转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，再次测序验证，然后将重组质粒转入 BL21（DE3）感受态细胞中。

1.5 中蜂 AcerOBP10 重组蛋白的原核表达及纯化

挑取含有正确 pET-30a/*OBP*10 重组质粒的 BL21（DE3）单菌落，以 1∶100（v/v）接种于 10 mL LB 液体培养基（含 50 μg/mL Kan^+）中过夜活化培养，翌日以 1∶50（v/v）接种至 200 mL LB 培养基中，37℃ 220 r/min 连续培养，至 OD_{600} 达到 0.8 时加入终浓度为1 mmol/L的 IPTG，于 30℃ 200 r/min 继续诱导培养 5 h。然后 10 000 r/min 5min 离心收集菌体，并用 0.02 mol/L 的 PBS 洗涤 2 次，然后加入细菌裂解液置于 4℃ 冰箱 30 min，经超声裂解后离心分为上清和沉淀，通过 12% 聚丙烯酰氨凝胶电泳检测目的蛋白的表达模式。确定表达模式后在梯度咪唑 PBS 缓冲液下进行目的蛋白纯化。将确定含有重组 AcerOBP10 蛋白的洗脱液转移至透析袋内，在透析 PBS（pH 7.4）缓冲液中透析 72 h，每 12 h 更换一次透析液，从而得到具有有生物学活性的 AcerOBP10 重组蛋白，然后利用酶标仪（瑞士 TECAN Genios）测定重组蛋白浓度。

1.6 中蜂 AcerOBP10 重组蛋白的配基结合实验

荧光光谱法体外研究昆虫 OBPs 蛋白与配基的结合技术已经比较成熟（李红亮等，2013；吴帆等，2015）。本实验选取 N-苯基-1-萘胺（N-phenyl-1-naphthylamine，1-NPN）作为 AcerOBP10 结合特性研究时的竞争性荧光探针。实验前将 1-NPN 用甲醇

溶液配制成终浓度为 1 mmol/L,并取已稀释至终浓度为 1 μmol/L AcerOBP10 于石英比色皿中。发射光谱扫描确定其激发波长为 281 nm,以 1-NPN 进行连续滴定,记录蛋白荧光发射光谱,直至蛋白最大荧光发射波长处的荧光值不再淬灭为止,记录此时 1-NPN 浓度,用 Scatchard 方程(1)线性化光谱数据(Hutchens *et al*., 1988; Chou, 2006):

$$\frac{[D_t]-[D]}{[D]} = -K([D_t]-[D]) + nK[P_t] \quad (1)$$

公式中$[D_t]$为滴定时加入的总 1-NPN 浓度,$[D]$为体系中反应平衡时游离的 1-NPN 浓度,K 为 AcerOBP10 与荧光报告子的结合常数,n 是两者结合位点数,$[P_t]$为实验中 AcerOBP10 的浓度。

根据荧光淬灭和竞争结合实验用来研究 AcerOBP10 的配基结合谱和结合能力。首先把能使蛋白峰值完全淬灭的 1-NPN 量加入到浓度为 1 μmol/L AcerOBP10 蛋白中,等待 1 min 充分混合反应。然后将甲醇配制的浓度为 10 mmol/L 候选配基逐次加入到 1-NPN 与 AcerOBP10 混合液中,记录荧光发射光谱和最大荧光峰值。根据方程(2)计算候选配基解离常数(K_D 值)(Chou, 2006):

$$K_D = \frac{[IC_{50}]}{1+\frac{[1\text{-NPN}]}{K_{1\text{-NPN}}}} \quad (2)$$

公式中$[IC_{50}]$为替换 50% 的 1-NPN 时的候选配基浓度,[1-NPN]是反应平衡时混合物中游离的 1-NPN 浓度,$K_{1\text{-NPN}}$为 AcerOBP10 与 1-NPN 结合实验时的解离常数。

2　结果

2.1　中蜂 OBP10 基因克隆及序列分析

成功克隆得到中蜂 OBP10 基因全长,序列如图 1 所示,其氨基酸序列位于核苷酸序列之下,方框标注为信号肽序列,圆圈标注的为保守的半胱氨酸位点。该基因已在 GenBank 中登录,序列号为 KP717060.1。其 ORF 全长序列为 450 bp,编码 149 个氨基酸,其中包含 6 个保守的半胱氨酸(Cys),蛋白分子量约为 17.04 kD,等电点约为 7.861。氨基残基中带正电荷的氨基酸有 16 个,带负电荷的有 14 个,非极性氨基残基有 53 个,不带电荷的极性氨基残基有 48 个。利用 SignalP 4.0 预测 AcerOBP10 蛋白的信号肽,其有明显信号肽,且信号肽切割位置位于 N 端第 22 与 23 位氨基酸(VHC-GT)之间。

进化树分析显示,该基因编码氨基酸序列与大蜜蜂 *Apis dorsata* 的 PBPs 进化关系最近,与佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* 和切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* 等一些蚂蚁的 PBPs 序列相似性也较高,不过与小蜜蜂 *Apis florea* 以及熊蜂 GOBP 也有一定的同源性,与中、意蜂的信息素结合蛋白 ASP1 较远,进化距离差异较大。不过从总体上看,AcerOBP10 更趋向于属于 PBPs 家族成员(图 2),又由于其与意蜂 OBP10 的相似性非常高(99%),因此命名其为 AcerOBP10。

2.2　中蜂 OBP10 基因原核表达及蛋白表达纯化

将 pMD18-T/*OBP*10 克隆载体酶切后把 OBP10 亚克隆至 pET-30a 载体中,并转化入 BL21(DE3)感受态细胞,诱导重组蛋白表达,结果表明 AcerOBP10 蛋白为包涵体形式表达,然后经镍柱纯化和梯度尿素 PBS 透析。如图 3 所示为蛋白诱导及梯度洗脱结果,其中泳道 7 为纯化后的 AcerOBP10 重组蛋白。

2.3　中蜂 AcerOBP10 配基结合实验

用 1 mmol/L 的 1-NPN 滴定 1 μmol/L AcerOBP10 蛋白,并用 Scatchard 方程进行线性拟合,结果如图 4

```
ATGAAATACTCGATACTGTTGAGCTTATTAATCACTTGCTTGATCTGGTCACCAATTGTTCATTGTGGGACACGACCGAGTTTTGTCTCTGACGAGATGATCGCAACAGCAGCCAGCGTG
M  K  Y  S  I  L  L  S  L  L  I  T  C  L  I  W  S  P  I  V  H  C  G  T  R  P  S  F  V  S  D  E  M  I  A  T  A  A  S  V
GTGAATGCTTGCCAGACACAGACAGGAGTGGCAACAGTGGATATAGAGGCAGTAAGGAATGGTCAATGGCCCGAAACACGTCAATTAAAGTGTTACATGTATTGTTTATGGGAACAATTC
V  N  A  C  Q  T  Q  T  G  V  A  T  V  D  I  E  A  V  R  N  G  Q  W  P  E  T  R  Q  L  K  C  Y  M  Y  C  L  W  E  Q  F
GGATTGGTGGATGACAAGAGAGAACTCAGTTTGAACGGCATGCTCACATTTTTCCAAAGAATACCAGCATACAGGGCTGAAGTTCAAAAAGCGATCAGCGAGTGCAAGGGGATCGGTAAA
G  L  V  D  D  K  R  E  L  S  L  N  G  M  L  T  F  F  Q  R  I  P  A  Y  R  A  E  V  Q  K  A  I  S  E  C  K  G  I  G  K
TATTTGGCAAAGGGCGACAATTGCGAATACGCGTACAGATTTAACAAATGTTACGCGGAATTGTCTCCACGGACGTATTATCTGTTTTAA
Y  L  A  K  G  D  N  C  E  Y  A  Y  R  F  N  K  C  Y  A  E  L  S  P  R  T  Y  Y  L  F  *
```

图 1　中华蜜蜂 OBP10 基因核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and amino acid sequence of AcerOBP10 gene of *Apis cerana cerana*

方框标记为预测的信号肽,圆圈标记为 6 个半胱氨酸 Predicted signal peptide sequence is labeled by boxes and six conservative Cys residues are labeled by circles.

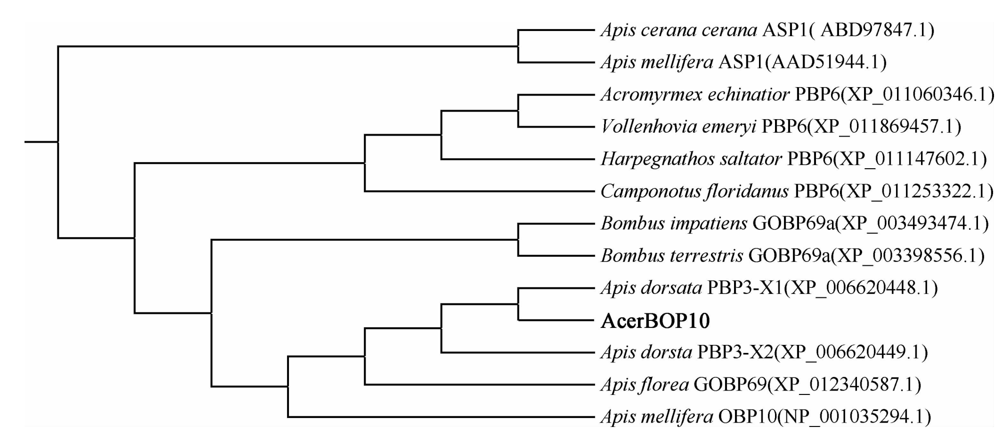


图 2　基于氨基酸序列构建的中华蜜蜂 OBP10 与其他昆虫同源蛋白的系统进化树分析(邻接法)

Fig. 2　The neighbor-joining (NJ) tree of AcerOBP10 with homologous proteins from other insect species based on the amino acid sequence

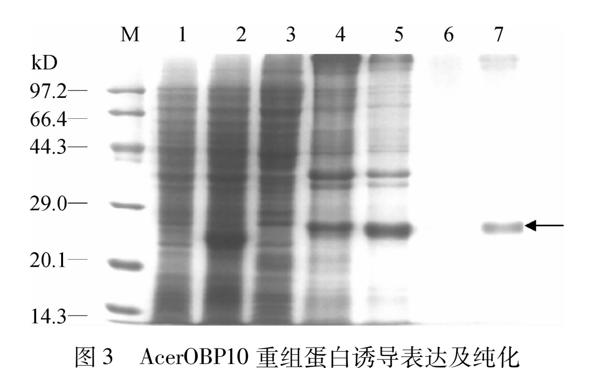


图 3　AcerOBP10 重组蛋白诱导表达及纯化

Fig. 3　Induced expression and purification of the recombinant AcerOBP10 protein

M：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker；1：未诱导的 pET30-OBP10 的 BL21 菌体 Bacterial product containing pET30-OBP10 without induction with IPTG；2：BL21 菌体中 AcerOBP10 蛋白诱导表达 Expression product after induction with IPTG；3：诱导后上清缓冲液 Bacterial supernatant buffer after ultrasonication；4：诱导后包涵体缓冲液 Bacterial inclusion body after ultrasonication；5：第一次上样过柱后的洗脱液 Supernatant of expression product after operated by affinity column；6，7：分别用含 50 和 200 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗脱后 AcerOBP10 蛋白 Recombinant AcerOBP10 protein eluted by PBS buffer containing 50 and 200 mmol/L imidazole, respectively. 箭头示目的蛋白. The arrow points to the target protein.

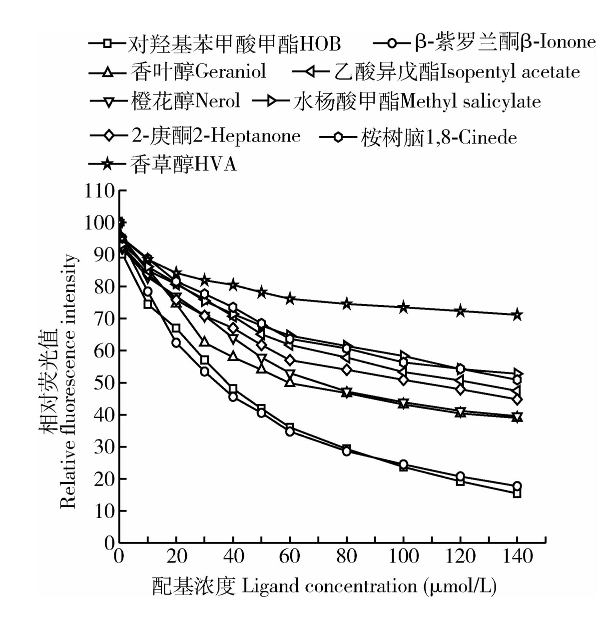


图 5　候选配基与 1-NPN 竞争结合重组 AcerOBP10 蛋白

Fig. 5　Competitive binding of candidate ligands with 1-NPN and recombinant AcerOBP10 protein

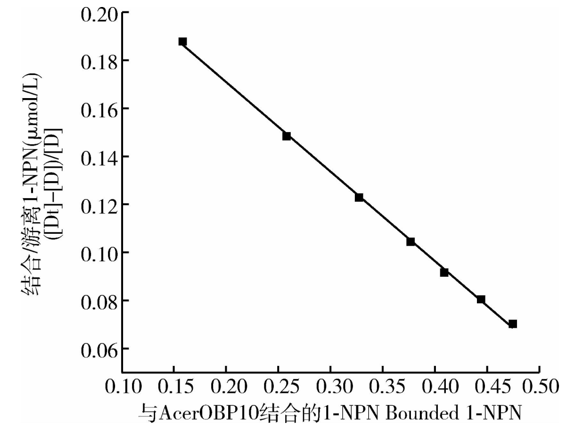


图 4　AcerOBP10 重组蛋白与 1-NPN 的结合 Scatchard 线性化方程

Fig. 4　Linearized scatchard equation of 1-NPN with the recombinant AcerOBP10 protein

所示:回归方程相关系数为 0.998,表明 AcerOBP10 与 1-NPN 的结合具有较好的线性关系。根据公式(1)分析得中蜂 AcerOBP10 与 1-NPN 的解离常数 $K_{1\text{-NPN}}=2.70$ μmol/L;结合位点数为 0.849。

以 1-NPN 作为报告子,进行候选配基竞争性结合试验,由图 5 可知,8 个候选配基能将 1-NPN 在 431 nm 处的相对荧光值竞争到 50% 以下,这显示 AcerOBP10 配基结合的广谱性,其中对羟基苯甲酸甲酯(HOB)具有较强的竞争结合能力,能将 1-NPN 报告子相对荧光值竞争至约 6%,说明它与 AcerOBP10 结合能力极强。根据上述公式 2,计算可得各个候选配基的解离常数(K_D 值),结果见表 1。

表 1 候选配基与 1-NPN 竞争结合重组 AcerOBP10 蛋白

Table 1 Competitive binding of candidate ligands with 1-NPN and recombinant AcerOBP10 protein

	化学配基 Chemical ligands	最大竞争力(%) Maximum competition	IC_{50} (μmol/L)	解离常数 K_D (μmol/L) Dissociation constant
信息素类 Pheromones	对羟基苯甲酸甲酯 HOB	6.06	37.49	11.04
	橙花醇 Nerol	32.84	70.27	20.69
	2-庚酮 2-Heptanone	36.95	106.48	31.35
	乙酸异戊酯 Isopentyl acetate	37.33	125.42	36.93
	香叶醇 Geraniol	44.63	134.53	39.61
	香草醇 HVA	71.18	–	–
植物挥发物 Plant volatiles	β-紫罗兰酮 β-Ionone	7.22	34.63	10.20
	桉树脑 1,8-Cinede	43.62	150.62	44.35
	水杨酸甲酯 Methyl salicylate	49.12	171.79	50.58

3 讨论

本实验提取中蜂工蜂触角总 RNA,利用 RT-PCR 技术,成功克隆得到中华蜜蜂 OBP10 基因 450 bp 的 ORF 序列全长,编码 149 个氨基酸,与中蜂 ASP1 和 ASP2 等类似,具有典型的 OBPs 家族特征,预测等电点为 7.861,偏碱性,与已报道的 OBPs 家族大多成员等电点偏酸性有所不同。利用 SignalP 4.0 预测 AcerOBP10 蛋白的信号肽切割位置位于 N 端第 22 与 23 位氨基酸(VHC-GT)之间。ExPASy 软件分析显示其亲水性平均系数(GRAVY)为 −0.302,是亲水性的蛋白,不稳定系数为 38.44,表明 AcerOBP10 在亲水性的环境中(如感器淋巴液)比较稳定。BlastX 结果显示它与多种昆虫的 PBPs 具有极高的相似性和同源性,这说明中蜂 OBP10 可能是 PBP-OBP 总科(PBP-OBP super-family)成员,对中蜂信息素识别和转运起到重要作用。

荧光竞争实验结果表明,AcerOBP10 与蜂王上颚信息素成分之一的对羟基苯甲酸甲酯(HOB)表现出较强的荧光竞争力,相对荧光值降至 6.06%,解离常数 K_D 达到了 11.04 μmol/L,表明二者结合较强。HOB 是中意蜂蜂王上颚信息素的成分之一,其在意蜂中主要发挥蜂群社会性调节的功能,包括调节工蜂卵巢激活(Hoover *et al.*, 2003)和抑制工蜂育新蜂王(Winston *et al.*, 1990)等,最近发现中蜂蜂王信息素也可以抑制工蜂卵巢激活和卵巢管数量下降(Tan *et al.*, 2015),此外其也发挥引诱雄蜂与处女王交尾的性引诱剂的功能(Slessor *et al.*, 1990)。本实验材料为工蜂触角,因此中蜂 AcerOBP10 有可能在中蜂生殖系统调控和社会行为中发挥一定作用。根据序列比对和体外生物活性分析等研究,我们认为 AcerOBP10 与此前我们已报道的一个中蜂 ASP1(李红亮等, 2008)一样,均属于信息素结合蛋白(PBPs)。但二者对蜂王信息素的结合谱有所不同,中蜂 OBP10 蛋白与 HOB 的结合要较 ASP1 强,与另一种西方蜜蜂特有的重要蜂王信息素成分香草醇(HVA)的结合能力却非常弱,而中蜂 ASP1 则与 HVA 有较强的结合能力(翁琛等, 2013)。由于 HOB 均存在于中、意蜂王信息素中,而 HVA 是意蜂蜂王信息素特有成分(Pankiw *et al.*, 1996),两者与蜂王信息素结合差异表明中蜂 OBP10 更倾向于对中蜂蜂王的识别,而 ASP1 则可能对中、意蜂王均产生识别。

除蜂王信息素以外,香叶醇、橙花醇、2-庚酮和乙酸异戊酯等信息素与 AcerOBP10 结合也较强,其中香叶醇与橙花醇是工蜂信息素(赵红霞等, 2014),2-庚酮和乙酸异戊酯是报警信息素(Brodmann *et al.*, 2009),它们对维持工蜂活动、采蜜及蜂群完整具有重要意义。相比 AcerOBP10,ASP1 实验结果表明它只对两种蜂王信息素特异性结合,对其他测试信息素基本不结合,说明 ASP1 对蜂王信息素具有更强的特异性(翁琛等, 2013)。以上表明,中蜂 OBP10 不仅对中蜂蜂王识别,也参与中蜂工蜂在营社会性活动中的信息交流和传递。值得注意的是,所有测试的幼虫信息素与中蜂 OBP10 和 ASP1 基本不结合或结合力很弱,这表明中蜂 OBP10 和 ASP1 在幼虫的哺育和维持方面作用不明显。

对于某些植物挥发性气味物质,与 ASP1 相似,OBP10 也可部分结合,这说明 2 种 PBPs 不仅能够识别和结合信息素,同样能结某些普通挥发性气味物质。然而两者的结合谱略有差异,OBP10 结合较好的为 β-紫罗兰酮(K_D = 10.20 μmol/L)、水杨酸甲酯(K_D = 50.58 μmol/L)和桉树脑(K_D = 44.35 μmol/L)(表 1),而 ASP1 与 4-烯丙基藜芦醚(K_D = 10.83 μmol/L)、β-紫罗兰酮(K_D = 14.69 μmol/L)、3, 4-

二甲基苯甲醛(K_D = 60.83 μmol/L)、苯乙醛(K_D = 105.00 μmol/L)和水杨酸甲酯(K_D = 150.32 μmol/L)有一定程度的结合(翁琛等, 2013),它们可以结合相同的配基分子(β-紫罗兰酮和水杨酸甲酯),不过 OBP10 对两者的结合力比 ASP1 更强,而 ASP1 较 OBP10 的普通植物源气味结合谱略宽,这表明 OBP10 仅对于某些植物源气味的选择性较强。有研究表明某些植物挥发物可以和信息素共同完成一些生理行为,如斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 性信息素诱芯成分顺 9,反 11-十四碳二烯乙酸酯和顺 9,反 12-十四碳二烯乙酸酯中加入一定量苯乙醛(PAA)能有效促进对其的引诱作用(沈幼莲等, 2009),小地老虎 *Agrotis ipsilon* 中信息素十二碳烯-1-醇乙酸酯[(*Z*)-7-dodecenyl acetate],十四碳烯乙酸酯[(*Z*)-9-tetradecenyl acetate]和十六碳烯-1-乙酸酯[(*Z*)-11-hexadecenyl acetate]对糖-乙酸混合溶液引诱功能有明显的抑制作用(Du, 2015)。由此可以推测,这些植物源气味物质可能与某种蜂王信息素或者工蜂信息素协同发挥作用,影响信息素的生物学功能,但具体作用机制还需要进一步研究。

此外,3 种普通植物挥发物中 β-紫罗兰酮结合最强,这与 ASP1(翁琛等, 2013)和 ASP2(李红亮等, 2013)等与 β-紫罗兰酮结合结果非常一致,由于 β-紫罗兰酮是很多开花蜜源植物中普遍存在的一种芳香气味成分(Gora and Burd, 1983; Peter *et al.*, 1993),通过对该气味物质的识别可能在蜜蜂寻找蜜源的定向中起作用,这也可能是中蜂包括信息素结合蛋白 OBP10 和 ASP1 在内的多种气味结合蛋白都对其有较强结合能力的原因之一。

综上所述,本研究克隆得到了一个新的中华蜜蜂信息素结合蛋白 OBP10 基因,并对其重组中蜂 OBP10 蛋白进行了体外功能研究,结果表明 AcerOBP10 与蜜蜂信息素类分子结合较强,尤其是蜂王信息素和工蜂信息素,其中对蜂王信息素成分之对羟基苯甲酸甲酯(HOB)结合最强,也可以和部分植物源挥发物质结合,这与先前发现和鉴定的 ASP1 均存在明显差异。这些结果将对于进一步研究中蜂信息素识别和传递提供理论基础,对于深入了解中蜂蜂群的社会行为机制,中蜂资源的保护和利用等均有重要的意义。

参考文献(References)

Brodmann J, Twele R, Francke W, Luo YB, Song XQ, Ayasse M, 2009. Orchid mimics honey bee alarm pheromone in order to attract hornets for pollination. *Current Biology*, 19(16): 1368–1372.

Chou TC, 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3): 621–681.

Du YJ, Feng B, Li HG, Liu CM, Zeng J, Pan LM, Yu Q, 2015. Field evaluation of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) pheromone blends and their application to monitoring moth populations in China. *Environ. Entomol.*, 44(3): 724–733.

Fernandez VM, Arenas A, Farina WM, 2009. Volatile exposure within the honeybee hive and its effect on olfactory discrimination. *J. Comp. Physiol. A*, 195(8): 759–768.

Gora J, Brud W, 1983. Progress in synthesis of sensory important trace components of essential oils and natural flavours. *Nahrung*, 27(5): 413–428.

Hoover SER, Keeling CI, Winston ML, Slessor KN, 2003. The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*, 90: 477–480.

Hutchens TW, Yip TT, Porath J, 1988. Protein interaction with immobilized ligands: quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatographic approaches using immobilized metal affinity adsorbents. *Anal. Biochem.*, 170(1): 168–182.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Meillor PNL, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 26(7): 833–844.

Jiang Y, Lei CL, Zhang ZY, 2002. The aggretation pheromones of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 822–832. [姜勇, 雷朝亮, 张钟宁, 2002. 昆虫聚集信息素. 昆虫学报, 45(6): 822–832]

Jin JY, Li ZQ, Zhang YN, Liu NY, Dong SL, 2014. Different roles suggested by sex-biased expression and pheromone binding affinity among three pheromone binding proteins in the pink rice borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 66: 71–79.

Kaissling KE, 2001. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chem. Senses*, 26(2): 125–150.

Kim MS, Repp A, Smith DP, 1998. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 150(2): 711–721.

Kocher SD, Grozinger CM, 2011. Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones. *J. Chem. Ecol.*, 37(11): 1263–1275.

Li HL, Gao QK, Cheng JA, 2008. Cloning and spatio-temporal expression of cDNA encoding pheromone binding protein ASP1 in *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(7): 689–693. [李红亮, 高其康, 程家安, 2008. 中华蜜蜂信息素结合蛋白 ASP1 cDNA 的克隆及时空表达. 昆虫学报, 51(7): 689–693]

Li HL, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2011. Molecular binding characterization with chemical ligands of a chemosensory protein AcerCSP3 in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* Fabricius (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(3):

259－264.［李红亮，张林雅，倪翠侠，商晗武，2011．中华蜜蜂化学感受蛋白 AcerCSP3 的配基结合功能分析．昆虫学报，54（3）：259－264］

Li HL，Zhang LY，Zhuang SL，Ni CX，Han BY，Shang HW，2013．Interpretation of odorant binding function and mode of general odorant binding protein ASP2 in Chinese honeybee（*Apis cerana cerana*）．*Scientia Agricultura Sinica*，46（1）：154－161．［李红亮，张林雅，庄树林，倪翠侠，韩宝瑜，商晗武，2013．中华蜜蜂普通气味结合蛋白 ASP2 的气味结合功能模式分析．中国农业科学，46（1）：154－161］

Pankiw T，Winston ML，Plettner E，Slessor KN，Pettis JS，Taylor OR，1996．Mandibular gland components of European and Africanized honey bee queens（*Apis mellifera* L.）．*J. Chem. Ecol.*，22（4）：605－615.

Pelosi P，Maida R，1995．Odorant-binding proteins in insects．*Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*，111（3）：503－514.

Pelosi P，Zhou JJ，Ban LP，Calvello M，2006．Soluble proteins in insect chemical communication．*Cell. Mol. Life Sci.*，63（14）：1658－1676.

Peter W，Sterfan B，Wilfried B，Matthias G，Rudolf H，Horst S，1993．Chirospecific analysis in essential oil，fragrance and flavor research．*Z. Lebensm. Unters. Forsch.*，196：307－328.

Radloff SE，Hepburn C，Hepburn HR，Fuchs S，Hadisoesilo S，Tan K Engel MS，Kuznetsov V，2010．Population structure and classification of *Apis cerana*．*Apidologie*，41（6）：589－601.

Shen YL，Gao Y，Du YJ，2009．The synergism of plant volatile compounds and sex pheromones of the tobacco cutworm moth，*Spodoptera litura*（Lepidoptera：Noctuidae）．*Acta Entomologica Sinica*，52（12）：1290－1297．［沈幼莲，高扬，杜永均， 2009．植物气味化合物与斜纹夜蛾性信息素的协同作用．昆虫学报，52（12）：1290－1297］

Slessor KN，Kaminski LA，King GGS，Winston ML，1990．Semiochemicals of the honeybee queen mandibular glands．*J. Chem. Ecol.*，16（3）：851－860.

Tan K，Liu X，Dong S，Wang C，Oldroyd BP，2015．Pheromones affecting ovary activation and ovariole loss in the Asian honey bee *Apis cerana*．*Journal of Insect Physiology*，74：25－29.

Vogt RG，Prestwich GD，Lerner MR，1991．Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects．*J. Neurochem.*，22（1）：74－84.

Weng C，Zhang LY，Zhao L，Fu YX，Luo C，Li HL，2013．Prokaryotic expression and ligand binding characteristics of pheromone binding protein ASP1 in the Chinese honeybee（*Apis cerana cerana*）．*Acta Entomologica Sinica*，56（10）：1110－1116．［翁琛，张林雅，赵磊，付余霞，罗晨，李红亮．2013．中华蜜蜂性信息素结合蛋白 ASP1 的原核表达及配基结合特性分析．昆虫学报，56（10）：1110－1116］

Winston ML，Higo HA，Slessor KN，1990．Effect of various dosages of queen mandibular gland pheromone on the inhibition of queen rearing in the honey bee（Hymenoptera：Apidae）．*Ann. Entomol. Soc. Am.*，83：234－238.

Wu F，Zhang XM，Zhao L，Cui XH，Li HL，Luo C，2015．Binding characterization of chemosensory protein CSP1 in the *Bemisia tabaci* biotype Q with plant volatiles．*Scientia Agricultura Sinica*，48（10）：1955－1961．［吴帆，张晓曼，赵磊，崔旭红，李红亮，罗晨，2015．Q 型烟粉虱化学感受蛋白 CSP1 与植物挥发物的结合特征．中国农业科学，48（10）：1955－1961］

Yang GH，2005．Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact．*Acta Entomologica Sinica*，48（3）：401－406．［杨冠煌，2005．引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响．昆虫学报，48：401－406］

Zhang H，Zeng ZJ，Yan WY，Wu XB，Zheng YL，2010．Effects of three aliphaticesters of brood pheromone on development and foraging behavior of *Apis cerana cerana* workers．*Acta Entomologica Sinica*，53（1）：55－60．［张晗，曾志将，颜伟玉，吴小波，郑云林，2010．幼虫信息素中三种酯类对中华蜜蜂工蜂发育和采集行为的影响．昆虫学报，53（1）：55－60］

Zhang TT，Gu SH，Wu KM，Zhang YJ，Guo YY，2011．Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera*（Hübner）and expression analysis of putative odorant-binding protein genes．*Biochem. Biophys. Res. Commun.*，407（2）：393－399.

Zhao HX，Liang Q，Zhang XF，Huang WZ，Chen HS，Luo YX，2014．The progress of chemical communication in the honeybee．*Chinese Agricultural Science Bulletin*，30（2）：1－6．［赵红霞，梁勤，张学锋，黄文忠，陈华生，罗岳雄，2014．蜜蜂化学通讯的研究进展．中国农学通报，30（2）：1－6］

（责任编辑：袁德成）